临床研究

豚鼠分泌性中耳炎鼓室硬化进程

李 琰[1],谢南屏[2],万良财[2],周丽枫[1],孙昌志[1]
[1]广州市妇女儿童医疗中心耳鼻喉科,广东 广州 510120;[2]南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉科,广东 广州 510282

摘要:目的 制作鼓室硬化豚鼠模型,验证分泌性中耳炎鼓膜置管是鼓室硬化的重要病因。**方法** 选择健康豚鼠50只,鼓室内注射肺炎链球菌液。注射7 d后选取有中耳积液的30只豚鼠,左耳置入鼓膜通气管,右耳行鼓膜切开作为对照。1个月、3个月、6个月后分别取A、B、C组豚鼠的中耳粘膜,观察其组织形态变化。**结果** 在制作模型3个月以及更长时间的实验耳中可出现鼓室硬化病理改变,组织纤维化程度及钙质沉积与通气管放置时间成正比。**结论** 鼓膜置管是鼓室硬化重要病因。临床鼓膜置管手术需谨慎。
关键词:鼓室硬化;豚鼠;鼓膜置管

The effect of myringotomy with ventilation tube insertion for otitis media in the formation of tympanosclerosis in guinea pigs

LI Yan[1], XIE Nanping[2], WAN Liangcai[2], ZHOU Lifeng[1], SUN Changzhi[1]
[1]Department of Otolaryngology, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China; [2]Department of Otolaryngology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To evaluate the role of myringotomy with ventilation tube insertion for otitis media with effusion in the pathogenesis of experimentally induced tympanosclerosis. **Methods** Fitty guinea pigs were underwent bilaterally tympanocentesis and inoculated with a suspension of Streptococcus pneumoniae to establish the model of tympanosclerosis. After 7 days, 30 guinea pigs showed evidence of otitis media with effusion and were chosen to preform the following experiments. The right ears were treated with myringotomy and inserted with ventilation tube, whereas the left ears were conducted myringotomy to serve as the control group. Middle ear membranes were obtained at 1, 3 and 6 months after the operation to observe the morphology changes of tympanic membranes and middle ear mucosa. **Results** The histopathological changes of tympanosclerosis were found in the right ears of the guinea pig models. There was a positive correlation between the duration of ventilation tube insertion and the extent of calcium deposition and fibrosis. **Conclusion** Myringotomy with ventilation tube insertion may be involved in the formation of tympanosclerosis. The surgical procedure should be considered carefully in clinical scenario.
Key words: tympanosclerosis; guinea pig; myringotomy; ventilation tube insertion

分泌性中耳炎在小儿中较多见,大部分可自愈,少数会进展甚至导致听力下降。在反复药物治疗失败情况下需行鼓膜置管手术。鼓膜置管术是临床治疗分泌性中耳炎的常用方法,术后即可明显改善患者听力,但许多学者研究表明鼓膜切置管术是导致鼓室硬化的重要病因。Pereira 等[1]对75 例(150耳)分泌性中耳炎患儿鼓膜切开置管术后随访38个月,发现鼓室硬化的发生率为23.3%。有学者将分泌性中耳炎患者鼓膜置管术后并发症进行荟萃分析,发现有32% 患者发生鼓室硬化[2]。为了对鼓室硬化进行早期干预和预防,降低鼓室硬化发病率,我们构建动物模型来进行此方面的实验研究,期待临床上对分泌性中耳炎患者发生鼓室硬化进行有效预防。

1 资料与方法

1.1 动物及分组

普通级健康豚鼠50只,体质量250~350 g ,雌雄不拘。入组豚鼠均为电耳镜检查光锥清晰,鼓膜完整,排除外耳道、中耳感染。TP注射针向鼓室注射0.1 mL灭活的肺炎链球菌液,7 d后选取有鼓室积液的豚鼠30只,将30只豚鼠随机分为3组,A组造模后1个月、B组造模后3个月、C组造模后6个月。左耳设为实验组(30耳),右耳设为对照组(30耳)。

1.2 主要仪器设备

手术显微镜,头皮针自制的硅胶通气管。

收稿日期:2016-02-01
作者简介:李 琰,主治医师,E-mail: 190690926@qq.com

1.3 动物模型

豚鼠腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)全麻后,右侧卧位,消毒左耳廓及外耳道皮肤,显微镜下于鼓膜前下象限切开、放置通气管。左侧卧位,消毒右耳后,鼓膜切开刀于前下象限切开,约1.5 mm。术后1月、2月、3月时,检查豚鼠,左耳通气管脱落的进行重新置管。

1.4 制作标本

造模1、3、6个月时将对应的该组豚鼠麻醉后处死,暴露听泡及周围结构,取出双侧听泡,电钻磨开外耳道骨壁,暴露鼓膜和鼓室腔,手术显微镜下观察鼓膜及中耳粘膜,予剥离子剥取中耳粘膜,置入10%甲醛液中固定3 h后取出,石蜡包埋切片,片厚4~6 μm,HE染色,在光学显微镜下进行观察。

1.5 统计方法

1.5.1 四格表资料的Fisher卡方检验 采用单侧检验,检验水准α＝0.05,用SPSS11.5软件包进行统计分析。分析实验组与对照组中鼓室硬化发生的百分率是否有统计学差异。

1.5.2 分层计数资料的Fisher卡方检验 将实验组按造模时间进行分层,采用单侧检验,检验水准α＝0.05,用SPSS11.5软件包进行统计分析,造模1个月组、造模3个月组、造模6个月组鼓室硬化发生情况。

2 结果

A组有1只豚鼠耳化脓,排除实验外。

2.1 形态学观察

豚鼠对照耳(n=30)鼓膜均愈合,鼓膜完整,光锥浑浊,未见钙化斑。A组(n=9),听泡骨壁增厚,鼓膜通气管脱落,鼓膜穿孔、浑浊。鼓室内见稀薄分泌物,鼓室粘膜轻度水肿、增厚。光镜下见:粘膜炎性改变,淋巴细胞浸润,未见钙化。B组(n=10),听泡骨壁进一步增厚,鼓膜增厚,颜色暗,鼓室粘膜水肿较1个月时减轻。3例标本光镜下见:中耳粘膜上皮下结缔组织内见钙化及玻璃样变,纤维组织增生。C组(n=10),有4例显微镜下见白色钙化斑,大小约0.2 cm×1.0 cm。 4例标本光镜下见:大量纤维组织增生,钙化范围扩大,玻璃样变物质减少。成骨细胞增生,新生骨组织(图1)。

2.2 统计结果

2.2.1 四格表资料Fisher x^2检验结果 单侧检验的结果:χ^2=6.525,v=1,P=0.011(单侧),按α＝0.05检验水准差异有统计学意义,可认为实验组(鼓膜置管)鼓室硬化的发生率高于对照组鼓室硬化的发生率。说明鼓膜置管的豚鼠鼓室硬化的发生率比正常豚鼠鼓室硬化的发生率高(表1)。

2.2.2 分层计数资料的Fisher χ^2检验结果 建立数据文件:以29例实验耳,30例对照耳,按时间分层,研究鼓膜置管对鼓室硬化发生的影响。以造模时间为分层变量,分别做造模后时间长短与鼓室硬化的相关性检验,按α＝0.05检验水准,结果显示造模3个月时,造模与鼓室硬化的发生在统计学无相关性,P=0.105(单侧),造模6个月时,造模与鼓室硬化的发生存在相关,P=0.043(单侧)。说明随着鼓膜切开置管时间的延长,鼓膜切开置管与鼓室硬化的相关性有增高的趋势。也就是说随着鼓膜切开置管术后时间的延长,鼓室硬化发生率有增高趋势(表1)。

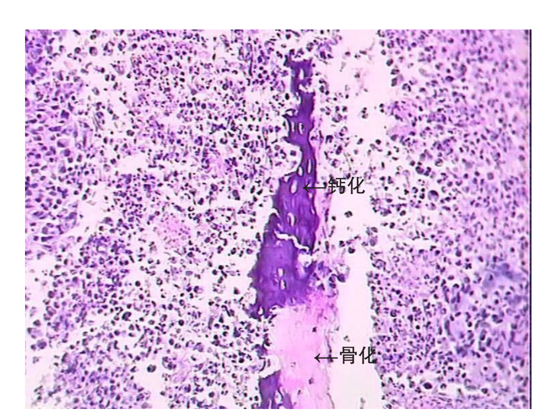


图1 造模6个月新生骨组织标本

表1 鼓室硬化的实验结果

Group	Research object	Tympanosclerosis	Percentage
A(1 month)	9	0	0%
B(3 months)	10	3	30%
C(6 months)	10	4	40%
N control	30	0	0%

3 讨论

鼓室硬化是中耳慢性炎症(包括非化脓性炎症和化脓性炎症)或急性感染反复发作而引起中耳粘膜下层和鼓膜固有层的退行性变,发病机制有多种,其中之一与分泌性中耳炎鼓膜置管有关[3]。

本实验中我们发现置管1月后粘膜下层或固有层出现结缔组织增厚,细胞密度增加,未发现钙质沉积现象,在置管3~6个月标本中,钙化发生在粘膜下层和内环状纤维层,钙化斑沉积程度和置管时间长短成正相关,钙化程度随时间延长而增加,组织学变化程度在组间和组内均存在差异。这个过程中钙化斑形成与人鼓室硬化表现相似,与John等[4]的研究结论一致。通过豚鼠分泌性中耳炎鼓膜置管可以得到鼓室硬化的动物模型,以便进行更深入的研究。

鼓膜置管是分泌性中耳炎常见治疗方法。我科就诊的儿童分泌性中耳炎患者比较常见,大部分患儿通过保守治疗治愈。有些患儿腺样体肥大、鼻窦炎并发分泌性中耳炎,药物治疗3个月效果欠佳,考虑鼓膜置管手

术。我们观察到术后患者听力显著提高,鼓膜置管并发症也不容忽视,如感染、穿孔、鼓室硬化等。Jassar 等[5]通过对置管术后患者进行9年随访,发现其中50%患者发生鼓室硬化。Johnston等[6]研究发现儿童分泌性中耳炎置管2年后鼓室硬化发生率为74.7%,未置管患儿鼓室硬化发生率为3.0%。本实验中置管3个月组鼓室硬化发生率为30%,置管6个月组发生率为40%。通气管放置的时间越长,发病率越高。

分泌性中耳炎鼓膜置管后发生鼓室硬化有以下因素:置管后鼓室内氧浓度增大,组织与通气管接触产生排异反应,置管后鼓膜与通气管相对固定也是原因之一[7]。大量的氧气进入中耳,氧自由基增加,激发了纤维化、透明样变性、凋亡等不可逆损伤,发生钙质沉着或骨化病变。Karlidag[8]检测中耳炎患者中耳黏膜标本和血浆中氧化反应指标,发现鼓室硬化组中耳黏膜标本中的一氧化氮、丙二醛活性及血浆中的丙二醛、红细胞过氧化氢酶活性均显著高于非鼓室硬化组,说明氧化反应在鼓室硬化发展中起一定作用。中耳通气管的大小、通气管的材质,置管时的创伤出血、置管时间、通气管的杠杆作用质量对鼓膜张力的影响都会影响到鼓膜硬化的发生。Dingle[9]认为,在分泌性中耳炎鼓膜置管术后,通气管留置时间是影响鼓室硬化发病率的最主要因素,时间越长,发病率越高。切口和鼓室继发感染也可能会引起鼓室硬化发生[10],本实验排除了感染因素。

预防鼓膜硬化很重要,其一旦发生,过程不可逆。目前临床应用有长效管和短效管。初次置管一般选择短效管,放置时间3~12个月。二次置管或者有腭裂病史的患儿,可置长效管,放置时间一般2年或以上。根据患儿病情选择。尽量避免或减少医源性并发症发生。置管3~6个月标本中大量纤维组织增生,增生的纤维组织排列紊乱,正常纤维组织走向和超微结构发生歪曲和断裂。McMin[11]推测细胞重建过程中不能再造出正常纤维走向,鼓室粘膜固有层结构在胚胎发育期已经形成。鼓室硬化的预防工作尤为重要。Wielinga[12]认为早期的再通气可以使钙质沉积完全消失但纤维组织的变化是不可逆的。

本实验中,置管位置选择鼓膜前下象限,于临床手术置管位置一致,保证模型相似性。同时,通气管如置于后部象限可能会损伤圆窗膜或听骨链而引起并发症。分泌性中耳炎鼓膜置管可以导致鼓室硬化发生,我们期待在临床工作中进行预防。国外一些专家已经对此进行研究。Uneri 等[13-14]通过大鼠实验发现维生素E涂层的硅胶管可降低鼓室硬化的发生率,并进一步研究72名鼓膜置管儿童,术后9个月发现经维生素E局部治疗的右耳仅15. 3%发生鼓膜硬化,而未经治疗的左耳鼓膜硬化发病率为30. 6%。表明鼓室内使用Vit E可以降低鼓室硬化发病率。还有许多学者报道有关抗氧化剂等药物预防鼓室硬化的动物实验研究[15]。国内目前还未看到相关实验,抗氧化剂能否应用于临床鼓室硬化预防有待进一步实验明确。

该实验表明鼓膜置管是鼓室硬化的一个重要病因,豚鼠鼓膜置管模型可以研究鼓室硬化的进程。鼓室硬化过程不可逆,临床鼓膜置管手术需谨慎。

参考文献:

[1] Pereira MB, Pereira DR, Costa SS. Tympanostomy tube sequelae in children with otitis media with effusion: a three-year follow-up study[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2006, 71(4): 415-20.

[2] Kay DJ, Nelson M, Rosenfeld RM. Meta-analysis of tympanostomy tube sequelae [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 124(4): 374-80.

[3] 李 琰, 谢南屏. 鼓室硬化的病因学研究进展[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(5): 419-20.

[4] John D, Giles J. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane:an experimental study[J]. Laryngoscope, 2002, 112(6): 1663-6.

[5] JJJassar P, Coatesworth A, Strachan DR. Long-term ventilation of the middle ear using a subannular tympanotomy technique: a follow-up study[J]. J Laryngol Otol, 2004, 118(12): 933-6.

[6] Johnston LC, Feldman HM, Paradise JL, et al. Tympanic membrane abnormalities and hearing levels at the ages of 5 and 6 years in relation to persistent otitis media and tympanostomy tube insertion in the first 3 years of Life: a prospective study incorporating a randomized clinical trial[J]. Pediatrics, 2004, 114(1): e58-67.

[7] Tos M, Bonding P, Poulsen G. Tympanosclerosis of the drum in secretory otitis after insertion of grommets. A prospective, comparative study[J]. J Laryngol Otol, 1983, 97(6): 489-96.

[8] Karlidaga T. Comparison of free radicals and antioxidant enzymesin chronic otitis media with and without tympanosclerosis [J]. Laryngoscope, 2004, 114(1): 85-9.

[9] Dingle AF, Flood LM, Kumar BU, et al. Tympanosclerosis and mini grommets: the relevance of grommet design[J]. J Laryngol Otol, 1995, 109(10): 922-5.

[10] J KERR.Tympanosclerosis.Clin.Otolaryngol, 1993, 18(4): 341-9.

[11] Mcminn R. Electron microscopic observations on the repair of perforated tympanic membranes in the guinea-pig[J]. Anat , 1975, 120(9): 207-17.

[12]Wielinga E, Kuijpers W. The influence of re-aeration of the middle ear on tympanosclerotic lesions in otitis media with effusion.In:Tos [C]//M:The hague kugler publications, 1997: 629-30.

[13] Uneri C, Sari M, Akboğa J, et al. Vitamin e-coated tympanostomy tube insertion decreases the quantity of free radicals in tympanic membrane[J]. Laryngoscope, 2006, 116(1): 140-3.

[14] Uneri C, Bağlam T, Yazici M. The effect of Vitamin E treatment on the development of myringosclerosis after ventilation tube insertion [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2006, 70(6): 1045-8.

[15] Aydogan F, Aydin E, Tastan E, et al. Is there any effect of coenzyme Q10 on prevention of myringosclerosis? Experimental study with rats[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2013, 79(3): 293-7.